Die Chemie des Zellkernes.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Medizin und Chirurgie
der hohen medizinischen Fakultät der Schlesischen
Friedrich-Wilhelmsuniversität zu Breslau

vorgelegt von

Dr. phil. nat. Andreas Pratje
aus Bremen.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus dem „Biologischen Zentralblatt“ Bd. 40, 1920.

Leipzig 1920
Verlag von Georg Thieme.

Die Chemie des Zellkernes.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Medizin und Chirurgie
der hohen medizinischen Fakultät der Schlesischen
Friedrich-Wilhelmsuniversität zu Breslau

vorgelegt von

Dr. phil. nat. Andreas Pratje
aus Bremen.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus dem „Biologischen Zentralblatt“ Bd. 40, 1920.

Leipzig 1920
Verlag von Georg Thieme.

Gedruckt mit Genehmigung der hohen Medizinischen Fakultät der Schlesischen Friedrich-Wilhelmsuniversität zu Breslau.

Berichterstatter: Prof. Dr. Kallius.

Dem Andenken meines lieben Vaters.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548211_0135

Die Chemie des Zellkernes.

Von

Dr. Andre Pratje.

Der Cytologe wird häufig vor die Frage gestellt, zu entscheiden, was für Gebilde er in den einzelnen Kernbestandteilen vor sich hat. Da finden wir die eigenartigsten Bildungen, die entweder mit dem indifferenten Namen eines Binnenkörpers bezeichnet werden, oder sie werden als „Nukleolen" aufgefaßt, während andere Autoren ihnen den Namen „Karyosomen" geben, worunter meistens Binnenkörper chromatischer Substanz verstanden werden, die häufig zu der Bildung der Chromosomen während der Mitose in irgendeiner Beziehung stehen sollen. Gibt es nicht Mittel, die geeignet sind, die Beschaffenheit der einzelnen Kernbestandteile nachzuweisen, insbesondere die Anwesenheit von Chromatin festzustellen? Können wir uns über die Natur der einzelnen Kerngebilde Klarheit verschaffen, wenn es uns möglich wäre, ihre chemische Zusammensetzung zu ergründen?

Im allgemeinen hat es der Cytologe und der Histologe mit morphologischen Begriffen zu tun. Bei den Begriffen des Zellkernes, des Plasmas, der Kernmembran, der Nukleolen, der Chromosomen u. s. w. denkt man ursprünglich an ihre äußere Gestalt und Form. Man muß sich klar bleiben, daß man eine neue, andere Betrachtungsweise einführt, wenn man nach der chemischen Beschaffenheit dieser Gebilde fragt. Aber diese andere, chemische Betrachtungsweise ist sehr wohl imstande, die morphologische zu ergänzen und uns manche morphologische Erscheinung verständlicher zu machen.

Nun sind aber, wie wir noch näher sehen werden, die bisherigen Ergebnisse der Chemie der Zelle und der des Zellkernes noch außerordentlich gering. Wenn wir nach der Ursache dieser geringen Kenntnisse auf diesem Gebiete fragen, so müssen wir uns daran erinnern, daß die „physiologische Chemie", die „Biochemie" selbst noch eine ganz junge Wissenschaft ist, die sich noch in den ersten Anfängen befindet. Wie wenig wissen wir über die so kompliziert gebauten Eiweißkörper und ihre Verbindungen! Da darf es auch nicht Wunder nehmen, daß die spezielle Mikrochemie dieser Stoffe innerhalb der Zelle bisher noch sehr wenig erforscht ist.

Bevor wir die einzelnen mikrochemischen Methoden näher kennen lernen, müssen wir wissen, mit welchen Substanzen wir es überhaupt zu tun haben; wir müssen uns befassen mit der Makrochemie der Stoffe, die wir in den Zellkernen finden. Was wissen wir über ihre Zusammensetzung und über ihren Aufbau?

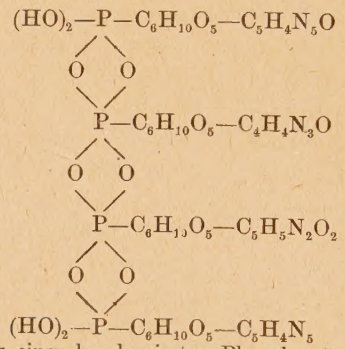
Bei dieser makrochemischen Betrachtung werde ich nur diejenigen Kapitel der Eiweißchemie behandeln, welche zur Chemie des Zellkernes, unserem eigentlichen Problem nähere Beziehung haben, und mich dabei auf das beschränken, was für den Cytologen von besonderem Interesse ist.

Bei der außerordentlichen Kleinheit der Zellkerne ist es von vorneherein klar, daß die makrochemische Untersuchung, d. h. die Untersuchung der Substanzen im Reagenzglase sehr erschwert ist. Diesem Übelstand hat man dadurch abzuhelfen versucht, daß man zur Untersuchung Stoffe und Organe verwendete, die sich durch einen

großen Zellkernreichtum auszeichnen. Miescher hat im Jahre 1871 die ersten Versuche hierüber angestellt und benutzte zu diesem Zwecke die Spermatozoenköpfe des Lachses, die ja fast ausschließlich aus Kernsubstanz bestehen. Auch bei allen späteren Untersuchungen über die chemische Beschaffenheit der Zellkernsubstanzen haben die Spermaköpfe von Fischen, insbesondere des Lachses und des Herings eine große Rolle gespielt. Als weitere, geeignete Objekte erwiesen sich kernhaltige rote und weiße Blutkörperchen und verschiedene zellreiche, drüsige Organe, bei denen die Zellkerne einen bedeutenden Prozentsatz der gesamten Trockensubstanz ausmachen. Von solchen drüsigen Organen ist das Pankreas, die Thymus, die Milz, Lymphdrüsen, Nebennieren, Leber u. a. näher untersucht worden. Auch aus Hefezellen, Bakterien und Pflanzen hat man die charakteristischen Substanzen isolieren können.

Dabei hat sich ergeben, daß wir in den Zellkernen stets Verbindungen von Eiweißkörpern mit verschiedenen Nukleinsäuren vor uns haben. Unseren nun folgenden Betrachtungen sind im wesentlichen die Darstellungen von O. Cohnheim (1911 und 1913) zugrunde gelegt. Die Verbindungen der Nukleinsäure mit Eiweißsubstanzen bezeichnet man als Nukleoproteide. Bevor wir die Nukleoproteide selbst betrachten, wollen wir uns kurz mit ihren Spaltungsprodukten beschäftigen, der Nukleinsäure und den Eiweißkomponenten, die zusammen die Nukleoproteide aufbauen.

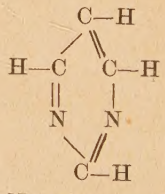
Die echten Nukleinsäuren aus der Thymusdrüse besitzen folgenden Aufbau (nach H. Steudel, 1912):



Sie bestehen also aus einer kondensierten Phosphorsäure und 4 Molekülen Glukosiden, welche ihrerseits aus je einer Hexose (Kohlehydrat) und einem Molekül der Basen Guanin, Cytosin, Thymin und Adenin zusammengesetzt sind. Die empirische Formel ist: $C_{43}H_{61}N_{15}P_4O_{34}$. Ihr Molekulargewicht ist 1455. Sie ist eine vierbasische Säure.

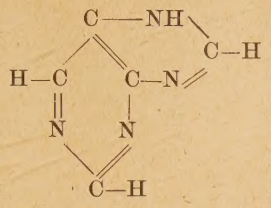
Es gibt noch andere Nukleinsäuren, so die Guanylsäure aus dem Pankreas und die Inosinsäure aus den Muskeln, welche wesentlich einfacher zusammengesetzt sind und aus je einem Molekül Phosphorsäure, einer Purinbase und einer Pentose bestehen.

Durch starke Säuren können die Basen der Nukleinsäure abgespalten werden. Von ihnen können das Thymin und das Cytosin teilweise in das Uracil übergeführt werden. Alle diese drei Stoffe sind durch den Besitz des Pyrimidinkerns ausgezeichnet, der sich auch in den Purinen wiederfindet. Das Pyrimidin ist ein Benzol, in dem zwei CH durch N ersetzt sind:



Die beiden anderen Basen der Nukleinsäure, das Guanin, und das Adenin gehören zu den sogenannten Purinbasen, es sind Aminopurine, die noch weiter in Xanthin und und Hypoxanthin umgewandelt werden können. Diese vier Basen leiten sich von dem

Purin-Ring ab, welcher aus dem eben erwähnten Pyrimidin-Kern und einem zweiten heterozyklischen Ring besteht:



Das Purin ist von Emil Fischer synthetisch aufgebaut worden. Zu den Purinderivaten gehört auch diie Harnsäure, die ein Trioxypurin darstellt.

Die Nukleinsäuren stellen ein im trockenen Zustande weißes, im kalten Wassser schwer lösliches Pulver dar, das sich jedoch in Alkalien leicht löst. Durch Mineralsäuren tritt eine Fällung ein, ebenso durch salzsäurehaltigen 50 % Alkohol und durch Schwermetalle. Diese ergeben unlösliche nukleinsaure Salze. Eiweißfarbreaktionen, wie die Millon'sche Probe und die Biuretreaktion, auch die Tryptophanreaktionen geben die reinen Nukleinsäuren im Gegensatz zu den Nukleinen und Nukleoproteiden nicht. Die Salze der Nukleinsäure, besonders das nukleinsaure Natron bilden sehr leicht Gallerten und kolloidale Lösungen.

Nach Altmann gibt die Nukleinsäure mit den Eiweißkörpern in saurer Lösung Niederschläge; es entstehen Salze der Nukleinsäuren mit dem Eiweiß.

Im lebenden Organismus werden die Nukleinsäuren durch Fermente zerlegt, durch die sogenannten Nukleasen, die sich im Pankreas, Thymus und Darmsaft finden. Im Säugetierkörper entsteht durch Fermentwirkung aus den Purinbasen die Harnsäure. Die Harnsäureausscheidung steigt mit der Zufuhr nukleinreicher Nahrung.

Als Eiweißpaarlinge der Nukleinsäure sind bisher Protamine und Histone nachgewiesen worden, welche zu den einfachen Eiweißkörpern gehören. Hier möge ein kurzes Schema der Eiweißeinteilung folgen (nach O. Cohnheim 1913):

I. Einfache Eiweißkörper:
   1. Albumine. } Proteine.
   2. Globuline. }
   3. Histone.
   4. Protamine.
   5. Gerüsteiweiße (früher Albuminoide.)

II. Umwandlungsprodukte:
   1. Acidalbumin und Alkalialbuminat.
   2. Albumosen, Peptone, Peptide.
   3. Halogeneiweiße u. s. w.

III. Proteide oder zusammengesetzte Eiweiße:
   1. Phosphorproteide (früher Nukleoalbumine oder Paranukleine).
   2. Nukleoproteide.
   3. Chromoproteide (Hämoglobin u. a.).
   4. Glykoproteide.

Die Albumine und die Globuline bezeichnet man auch als Eiweißstoffe im engeren Sinne, als genuine oder native Eiweißstoffe. Durch Koagulation oder durch Säuren oder Alkalien werden diese „Proteine" denaturiert, d. h. durch Abspaltungen umgewandelt, wobei meist Albuminate entstehen. Die Albumine sind in Wasser löslich, die Globuline meist nur in verdünnten Salzlösungen. Die Albumine sind meist schwerer fällbar als die Globuline und die Proteide.

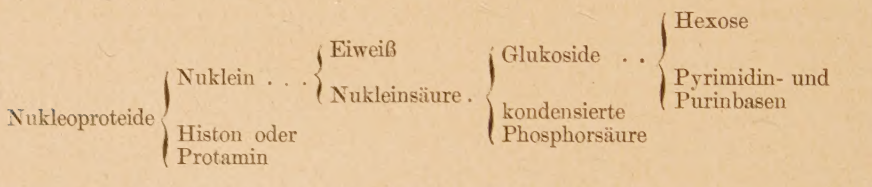
Die Gerüsteiweiße sind im Gegensatz zu den anderen Eiweißstoffen meist unverdaulich und für die Ernährung wertlos; sie kommen nur als Interzellularsubstanzen vor, wenn sie auch von den Zellen selbst produziert werden.

Die Histone und die Protamine sind, wie bereits erwähnt, als Eiweißpaarlinge der Nukleinsäuren nachgewiesen worden.

Die Histone sind Eiweißkörper, die einen stark basischen Charakter besitzen. Die wichtigste der in ihnen enthaltenen Basen ist das Arginin. Sie haben einen hohen N-Gehalt und einen geringen S-Gehalt. Infolge ihres basischen Charakters werden sie durch Alkalien gefällt und sind in Säuren leicht löslich. Durch diese Reaktion unterscheiden sie sich von den Eiweißkörpern mit saurem Charakter, insbesondere den Globulinen und dem Casein. Die Histone sind hauptsächlich in ihren Verbindungen mit der Nukleinsäure in den Zellkernen bekannt. Sie wurden von Lilienfeld in den Kernen der weißen Blutkörperchen der Thymus, von Kossel in dem unreifen Samen eines Seeigels und von Miescher in dem unreifen Samen einiger Fische nachgewiesen, während die Hoden des Lachses und der Makrele im reifen Zustande Protamine enthalten.

Die Protamine werden je nach den Fischen, in denen sie vorkommen, als Salmin, Scombrin, Clupein, Sturin u. s. w. bezeichnet. Im Jahre 1874 wurde das erste Protamin durch Miescher in den Spermatozoenköpfen des Lachses gefunden. Die Protamine sind sehr starke Basen, noch stärker als die Histone und enthalten einen noch höheren Prozentsatz von Arginin. Vor allen anderen Eiweißen zeichnen sie sich durch das Fehlen des Schwefels aus. Die Protamine sind vor allem durch Kossel näher untersucht worden. Durch Erhitzen werden die Protamine nicht koaguliert; aber durch Behandlung mit Alkaloidreagentien entsteht schon bei alkalischer Reaktion eine Fällung.

In dem Fischhoden finden wir direkte salzartige Verbindungen der Nukleinsäure mit Protaminen und Histonen, die wir als Nukleoproteide bezeichnen. Bei anderen Nukleoproteiden werden bei der Spaltung durch Pepsinsalzsäure nicht direkt Nukleinsäuren frei, sondern sogenannte „Nukleine“, welche ihrerseits wieder in Eiweiß und Nukleinsäure gespalten werden können. Das läßt sich in folgendem Schema darstellen:



In diesem Falle ist also die Nukleinsäure mit zwei Molekülen Eiweiß verbunden, von denen das zweite, bisher noch nicht näher bekannte sehr viel fester an die Nukleinsäure gebunden ist als das erste und sich schwerer abspalten läßt.

Die Nukleoproteide sind in reinem Zustande weiße Pulver, welche in Wasser, Salzlösungen und Alkalien löslich sind. Wir haben deutlich saure Eiweißkörper vor uns, die durch Hitze und Fällungsmittel koaguliert werden können. Hierdurch wird der Eiweißbestandteil verändert, während die Nukleinsäure auch aus den gefällten Körpern dargestellt werden kann.

Der saure Charakter der Nukleoproteide stimmt sehr gut mit dem basophilen Verhalten der chromatischen Substanz gegenüber Anilinfarben in den Zellkernen überein, d. h. diese Substanz stellt eine Säure dar; ob sie aber wirklich aus Nukleoproteiden besteht, können wir noch nicht mit Sicherheit entscheiden. Es wäre auch denkbar, daß das Chromatin aus Nukleinsäure selbst bestünde, und daß das Eiweiß in anderen Substanzen, im Linin oder in anderen ungefärbten Zwischensubstanzen enthalten sei. Auf die Schlüsse, welche uns das Verhalten der Zellkerne gegenüber Anilinfarben auf ihre chemische Struktur gestatten, werde ich weiter unten näher eingehen.

Die erwähnten Nukleine stellen nur Spaltungsprodukte dar und stehen in ihrem chemischen Verhalten in der Mitte zwischen den Nukleinsäuren und den Nukleoproteiden, aus denen sie nach Miescher durch Pepsinsalzsäure gewonnen werden können. Es tritt dadurch eine Eiweißspaltung ein. Durch Alkalien können die Nukleine weiter zerlegt werden: es bilden sich Eiweißstoffe und nukleinsaure Alkalien. Da die Nukleine noch zum Teil aus Eiweißkörpern bestehen, geben sie die Reaktionen der Eiweißkörper, während die eigentlichen Nukleinreaktionen, welche Zacharias, Carnoy und Miescher angegeben haben, auf der Wirkung der Nukleinsäure beruhen.

In der obigen Tabelle der Eiweißstoffe finden wir unter den zusammengesetzten Eiweißkörpern an erster Stelle die sogenannten Phosphorproteide bezeichnet, die früher Nukleoalbumine genannt wurden. Der Name „Nukleoalbumine" zeigt, daß man früher an eine enge Verwandtschaft dieser Stoffe mit den Nukleoproteiden glaubte. Doch es ist durch neuere Untersuchungen klar geworden, daß die Nukleinsäure, die charakteristischste Komponente der Nukleoproteide den Nukleoalbuminen fehlt; daß sie sich also recht fernstehen. Sie entsprechen sich nur in ihrem Verhalten gegenüber Pepsinsalzsäure, durch welche die Phosphorproteide in eine Eiweißkomponente und in einen phosphorhaltigen Eiweißkomplex gespalten werden, den Kossel als Paranuklein bezeichnete, während andere ihn Pseudonuklein nannten, in äußerem Vergleich zu dem Nuklein der Nukleoproteide.

Die bekanntesten Phosphorproteide sind das Casein der Milch und das Vitellin des Eidotters. Schon lange ist bekannt, daß sich der Dotter gegen gewisse Farbstoffe und Reagentien genau so wie das Chromatin verhält. Daher nahm man ursprünglich an, daß die Dottersubstanzen aus Nukleinen bestünden. Das ist aber nicht der Fall. Hieraus ersehen wir, daß man nicht berechtigt ist, aus einem analogen färberischen Verhalten Schlüsse auf die chemische Beschaffenheit der Substanzen zu ziehen.

Diese verschiedenen Stoffe sind mit den Methoden der Makrochemie in den Zell- und Kernsubstanzen nachgewiesen worden. Wir haben daher das Recht anzunehmen, daß die Bestandteile der Kerne und Zellen aus ihnen bestehen. Hierdurch wissen wir aber noch nichts darüber, welche Teile der Zelle und der Kerne aus den einzelnen Substanzen aufgebaut sind. Wir wissen nicht, ob sie in Mischung oder getrennt und auf die einzelnen Strukturen verteilt in den Zellen vorkommen. Diese Verhältnisse aufzuklären ist die Aufgabe der eigentlichen Mikrochemie der Zelle und der Färbemethoden.

Ist es möglich, irgendwelche Färbemethoden zu finden, die uns über die chemische Beschaffenheit der einzelnen Kernbestandteile Auskunft geben? Die Färbetechnik hat bekanntlich in der modernen Histologie und Cytologie einen großen Umfang angenommen; sie wird dazu benutzt, die einzelnen Strukturelemente der Zelle zur klareren Anschauung zu bringen. Können wir aus einer bestimmten Färbbarkeit der Kernbestandteile mit bestimmten Farben irgendwelche Schlüsse auf den chemischen Aufbau des Kernes machen?

Schon in der ersten Zeit, als man begann, die Anilinfarben in die mikroskopische Technik einzuführen, bemerkten die Untersucher, daß sich die verschiedenen Zellbestandteile den Farben gegenüber verschieden verhalten; daß manche Teile der Zelle eine gewisse Vorliebe für bestimmte Farbstoffe zeigten, mit denen sie sich vorwiegend färbten. Man verwandte Gemische aus roten, blauen und grünen Farbstoffen. Diejenigen Zellelemente, welche aus diesen Gemischen in erster Linie die roten Farben aufnahmen, bezeichnete man als erythrophil, während die Bestandteile, welche sich blau oder grün färbten, cyanophil genannt wurden. Als roter Farbstoff wurde meistens das Säurefuchsin verwandt, als blauer Methylenblau, Methylgrün oder Jodgrün. Doch bald zeigte es sich, daß man auch direkt umgekehrte Verhältnisse erzielen kann, wenn man andere Farbgemische anwandte, so bei Saffranin-Lichtgrün oder bei der modernen Ro-

manowsky-Giemsafärbung. Man mußte daher jenen Gegensatz zwischen erythrophil und cyanophil fallen lassen.

Ehrlich stellte fest, daß nicht die Farbe, sondern ein anderes Moment ausschlaggebend ist, nämlich die chemische Konstitution der Farbstoffe. Man unterscheidet zwischen basischen und sauren Farben. Die Zellkerne nehmen aus Farbgemischen in erster Linie die basischen Farbstoffe auf, denen man daher auch den Namen „Kernfarbstoffe" gegeben hat. Die Kerne selbst bezeichnet man als basophil, während die Zellbestandteile, die eine Vorliebe für die sauren Farbstoffe zeigen, acidophil genannt werden. Diese Einteilung in acidophile und basophile Zellbestandteile hat sich bis auf den heutigen Tag erhalten.

Auch Flemming kannte bereits das Verhalten der Kernbestandteile gegenüber den Anilinfarben und gründete darauf seine Definition des Chromatins. Er stellte diesen Begriff im Jahre 1880 auf: „Mit Chromatin soll nur bezeichnet werden diejenige Substanz im Zellkern, welche bei den als Kerntinktionen bekannten Behandlungen mit Farbstoffen die Farben aufnimmt." Er fügt sehr vorsichtig hinzu, daß diese Färbungen nur am toten Objekt auftreten, das Chromatin sei dort im körnigen Zustande vorhanden; wie es sich damit aber im lebenden verhielte, wüßten wir nicht sicher. Der Unterschied zwischen basischen und sauren Farbstoffen war damals noch nicht bekannt. So rechnete Flemming neben dem Netzwerk der Kerne auch ihre Membran und die Nukleolen zum Chromatin. Auch hier drückt er sich sehr vorsichtig aus: wir wüßten nicht, inwiefern die färbbare Substanz der Nukleolen spezifisch verschieden von dem Chromatin in den Gerüsten sei.

Als der Unterschied zwischen basischen und sauren Farbstoffen bekannt wurde, fand man, daß die meisten Nukleolen eine Vorliebe nicht für die basischen, sondern für die sauren Farben haben, welche sie aus heterogenen Farbgemischen auswählen. Nun änderte man jene Definition des Chromatins von Flemming dahin, daß man mit dem Begriff des Chromatins alle diejenigen Substanzen im Kern bezeichnet, die sich mit basischen Farbstoffen färben, die sich also basophil verhalten.

Dieses Verhalten der Kerne und der anderen Zellbestandteile gegenüber den verschiedenen Anilinfarben scheint auf den ersten Blick geeignet, über ihre chemische Natur etwas auszusagen. Die Kernelemente, welche vorwiegend die basischen Farbstoffe aufnehmen, werden höchstwahrscheinlich einen sauren Charakter besitzen.

Die makrochemischen Untersuchungen haben uns gezeigt, daß die Nukleinsäure und in ihr die Phosphorsäure in den Kernen vorkommt, und daß auch ihre Eiweißverbindungen, die Nukleoproteide noch einen deutlich sauren Charakter haben. Deshalb machte man diese Stoffe für die Färbung mit den basischen Kernfarbstoffen verantwortlich und glaubte in ihnen ein Mittel gefunden zu haben, um die Nukleinsäure, bezw. ihre Verbindungen, die Nukleine und Nukleoproteide im Kern nachzuweisen.

Lilienfeld vergleicht die Färbung chemisch reiner Nukleinsäure mit derjenigen der Chromosomen in einem Farbgemisch und kommt zu dem Schluß, daß die Chromosomen in der Mitose höchstwahrscheinlich aus freier oder sehr eiweißarmer Nukleinsäure bestehen. Er wollte bei der Färbung mit Methylgrün-Säurefuchsin sogar an den feineren Nuancierungen des auftretenden Farbtons die einzelnen Nukleinsäureverbindungen unterscheiden: Nukleohiston soll sich deutlich grünblau (vorherrschend blau) färben, Nuklein blau-grün und Nukleinsäure intensiv grün.

Auch Rohde, welcher ein Jodgrün-Fuchsingemisch verwandte, schließt aus der Tatsache, daß sich die Kerne entweder intensiv grün oder mehr oder weniger violett-rosa färben, daß in den Kernen Nukleoproteide von sehr verschiedenem Phosphorgehalt vorkommen.

Malfatti und Zacharias stellten ebenfalls durch ausgedehnte Untersuchungen fest, daß sich die Nukleinsäure bezw. das Nuklein aus Hefezellen und Lachsspermatozoenköpfen nach entsprechender Vorbehandlung mit basischen Farbstoffen färbt. Ebenso wie diese freie Nukleinsäure und wie die Nukleine färbte sich die Hülle der Spermatozoenköpfe und die chromatischen Substanzen pflanzlicher Zellkerne, was darauf hinzuweisen scheint, daß in der Hülle der Spermatozoenköpfe bezw. in den Zellkernen Nukleinsäuren und Nukleine vorhanden sind.

Alle Eiweißkörper können sowohl als Säure wie auch als Base Verbindungen eingehen; sie haben eine doppelte, „amphotere“ Natur, wenn sie auch in erster Linie immer nach einer bestimmten Seite hin reagieren. Also müßten auch die Eiweißstoffe, die im Chromatin enthalten sind, teils als Säuren, teils als Basen wirken können und dementsprechend die sauren oder basischen Farbstoffe bevorzugen. Deshalb unterscheidet Heidenhain zwischen Basichromatin und Oxychromatin. Substanzen, die sich mit sauren Farben färben und die basischen vollständig verschmähen, noch als „Chromatin“ zu bezeichnen, widerspricht eigentlich der bisherigen Definition des Chromatins. Aber man sah sich zu diesem Ausweg genötigt, weil manche Kerne in ihrer Entwicklung aus einem chromatinreichen in einen chromatinarmen Zustand übergehen. Bei einer neuen Teilung des Kernes wird der Chromatingehalt wieder erhöht. Wir haben eine periodische Zu- und Abnahme der Substanz vor uns, die sich mit den eigentlichen Kernfarbstoffen färbt; während ein Teil der Gebilde, die sich morphologisch aus den Chromosomen ableiten lassen, nicht die basischen, sondern die sauren Farbstoffe an sich zieht. Es sind dies kleine Körnchen, die die gleiche Form wie die basichromatische Granula besitzen und mit ihnen im Liningerüst eingelagert sind. Heidenhain bezeichnet sie als „Oxychromiolen“. Er vermutet, daß wir in dem Basichromatin phosphorreiche, in dem Oxychromatin phosphorarme Nukleine vor uns haben.

Die Erscheinung, daß das Chromatin im engeren Sinne die Kernfarbstoffe an sich zieht, versuchte man dadurch zu erklären, daß man annahm, daß die sauren Nukleoproteide mit den basischen Farbstoffen salzartige chemische Verbindungen eingehen. Ebenso suchte man zu beweisen, daß auch die anderen Färbungen auf einer chemischen Bindung der Farbstoffe durch die Eiweißkörper beruhe. Man stellte die chemische Theorie der Färbung auf, die hauptsächlich von Heidenhain und Paul Mayer vertreten wird.

Diese chemische Theorie der Färbung hat einen lebhaften Widerspruch gefunden und eine sehr eingehende Kritik durch Alfred Fischer, welcher 1899 in seinem Buch über „Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas" umfangreiche Untersuchungen mitteilte über die Wirkung der verschiedenen Fixierungs- und Färbungsmittel. Er bestreitet, daß die Färbung histologischer Präparate auf einer chemischen Verbindung zwischen Farbstoff und Zellbestandteilen beruhe und stellt statt dessen eine physikalische Theorie der Färbung auf. Er hat gezeigt, daß der gleiche Eiweißstoff, den er aus verschieden konzentrierten Lösungen ausgefällt hat, Granula von verschiedener Größe ergibt, von denen sich die großen mit basischen, die kleinen mit sauren Farbstoffen färbten. Der gleiche chemische Körper färbt sich also je nach den verschiedenen physikalischen Eigenschaften verschieden, bedingt durch die verschiedene Größe der Granula. Die Färbung könne also kein chemischer Vorgang sein.

Um die Einwirkung der einzelnen Anilinfarben auf die Eiweißstoffe zu untersuchen, benutzte Fischer zu seinen Untersuchungen nicht die natürliche Zelle, da wir es in ihr nicht mit genau charakterisierten Substanzen zu tun haben. Die Fixierungsmittel rufen an dem Zellinhalt chemische und physikalische Veränderungen hervor, die uns im einzelnen gänzlich unbekannt sind, die aber sicher die Aufnahmefähigkeit der einzelnen Zellbestandteile wesentlich verändern. Deshalb verwandte Fischer chemisch genau definierte und wohl bekannte Stoffe. Das Verhalten dieser Substanzen in verschiedenen Farbgemischen wurde verfolgt, und es wurde festgestellt, ob bestimmte chemisch genau charakterisierte Stoffe eine gewisse Vorliebe für bestimmte Farbstoffe zeigen, d. h. ob sie immer bestimmte Farbstoffe aus den Farbgemischen auswählen, während sie andere Gruppen von Farbstoffen meiden.

Solche Untersuchungen haben zuerst Lilienfeld und Zacharias unternommen, indem sie die Färbungsgemische an chemischen Präparaten von Eiweißkörpern und Nukleinsäuren ausprobierten.

Alfred Fischer und Walter Berg haben diese Versuche in großem Umfange wieder aufgenommen und durchgeführt. Ihnen erschienen auch die Eiweißkörper in Substanz und in Lösung ungeeignet, und deshalb verwandten sie künstlich erzeugte Granula und Gerinnsel, die den fixierten Objekten sehr viel ähnlicher sind; die sich aber vor jenen dadurch auszeichnen, daß die Ausgangsstoffe bekannt sind, näm-

lich die Eiweißlösungen und die verwandten Fällungsmittel. Auf diese Weise wurden Granula und Körnchen der verschiedensten Größe hergestellt.

Berg arbeitete außer mit dem von Fischer verwandten Grübler-schen Hefenuklein noch mit anderen Nukleinpräparaten, bei denen er teilweise abweichende Resultate erhielt. Berg zeigte weiter, daß man aus der Wirkung eines Fixierungsmittels auf die Lösung eines Proteids nicht auf die Wirkung schließen dürfe, welche diese Mittel auf das als Strukturträger in der Zelle vorhandene Proteid habe, da der Zustand der Proteide daselbst nicht identisch sei mit dem in den Lösungen. Vertreter derselben Körpergruppe, z. B. der Nukleinsäuren verhalten sich sehr verschieden, je nach ihrer Herkunft; sie geben teilweise Fällung mit Eisessig, teilweise keine.

Diese Ergebnisse Berg's zeigen uns, daß wir sehr vorsichtig sein müssen, aus solchen Analogien sowohl der Fällungen als auch der Färbungen Schlüsse auf die chemische Beschaffenheit der einzelnen Strukturelemente im Zellkern zu machen.

Als wichtigste Ursache der Färbung nimmt Fischer die Oberflächen-Attraktion und Adsorption an. Das Adsorptionsvermögen bedingt in erster Linie die Auswahl bestimmter Farben aus heterogenen Farbgemischen. Dieses Adsorptionsvermögen hängt nun keineswegs von dem chemischen Aufbau der betreffenden Substanzen ab; denn Peptone und Nukleinsäuren, zwei chemisch ganz verschiedene Stoffe, zeigen die gleichen Färbungen, haben also ein sehr ähnliches Adsorptionsvermögen.

Haben wir nicht verschiedene Stoffe, sondern ein homogenes Substrat vor uns, das aus Granulis verschiedener Größe zusammengesetzt ist, die aber aus der gleichen Substanz bestehen, so färben sich diese Granula und Körnchen entsprechend der relativen Diffusionsgeschwindigkeit und der verschiedenen Konzentration der einzelnen Farblösungen.

Sehr wichtige Aufklärungen in der Frage der Theorie der Färbungen dürfte das neuerdings so lebhaft in Angriff genommene Gebiet der Dispersoid- oder Kolloidchemie geben.

Der kolloidale Zustand der Substanzen ist wichtig für ihre Färbung. Denn je nachdem die Dispersion des Stoffes größer oder kleiner ist, werden sie ein verschiedenes Adsorptionsvermögen den Farbstoffen gegenüber zeigen. Die adsorbierende Oberfläche der dispersen Teilchen ist sehr verschieden, je nach dem Grad der Dispersion. Der Dispersionsgrad wechselt außerordentlich. In manchen Fällen haben wir grobdisperse Formen vor uns in Gestalt von mikroskopisch sichtbaren Körnchen. In den meisten lebenden Zellen kommen die Eiweißstoffe und andere Verbindungen im kolloidalen Zustand vor. Der Dispersionsgrad ist schon größer als bei dem grobdispersen, während die einzelnen dispersen Teilchen in ihrer Größe unter die Grenze der mikroskopischen Sichtbarkeit herabgesunken sind. Viele Stoffe kommen

schließlich im molekulardispersen oder kristalloiden Zustand vor, d. h. wir haben echte Lösungen vor uns, in denen sich die betreffenden Stoffe als Moleküle verteilt finden. Die Größe der einzelnen Moleküle ist je nach dem Stoffe sehr verschieden. Die komplizierten Eiweißverbindungen bestehen aus sehr großen Molekülen, während die Molekulargröße der Spaltungsprodukte sehr viel kleiner ist. Die verschiedenen Stoffe haben eine ganz verschiedene Neigung, Moleküle aneinander zu lagern und größere Molekularverbände zu bilden. Einfachere Stoffe wie Nukleinsäure und Peptone werden im allgemeinen einen größeren Dispersionsgrad aufweisen, als z. B. Albumine und Nukleoproteide. Diese kommen meistens im kolloidalen Zustand vor.

Noch größere Differenzen werden nach verschiedener Fixierung auftreten. Denn je nach dem Fixierungsmittel werden wir verschieden große Fällungsgebilde erhalten, teils große oder feinere Granula, teils bleiben die Stoffe in kolloidalem Zustand oder in Lösung. Kurz wir finden die allergrößten Verschiedenheiten des Dispersionsgrades vor uns und entsprechend werden sich auch die gleichen chemischen Substanzen, je nach der Größe ihrer adsorbierenden Oberfläche den Farbstoffen gegenüber verschieden verhalten.

Etwas wird allerdings das Adsorptionsvermögen wie jede andere physikalische Eigenschaft, auch von der chemischen Natur des betreffenden Stoffes abhängen, auch wenn die Bindung nicht nach chemischen, sondern nach mechanischen Gesetzen erfolgt ist.

Nicht nur die physikalischen Eigenschaften der zu färbenden Objekte sind für den Ausfall der Färbung ausschlaggebend, sondern auch die physikalischen Eigenschaften der Farblösungen sind von Bedeutung. Daß die Diffusionsgeschwindigkeit dabei eine Rolle spielt, hörten wir bereits. Je größer die relative Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoffe ist, desto leichter werden diese färben; deshalb färben die basischen Farben leichter als die sauren.

Nicht weniger wichtig ist die relative Löslichkeit der Farbstoffe. Es ist jedem bekannt, daß sich fast alle sauren Farbstoffe sehr viel leichter in Wasser lösen, als die basischen. Aber umgekehrt werden gerade die schwerlöslichen Stoffe sehr viel leichter ausfällen; und da es sich bei der Färbung wahrscheinlich um einen Niederschlag aus der Farblösung handelt, so werden die schwerer löslichen Farben auch sehr viel stärker färben.

Sehr wichtig zur Erklärung des Vorgangs der mikroskopischen Färbung sind die Methoden und die Erklärungsversuche, die in der technischen Färberei angewandt werden. Bei der großen Bedeutung der technischen Färberei sind selbstverständlich hier die Methoden sehr viel eingehender untersucht worden. Zur Erklärung der sogenannten „substantiven" Färbungsprozesse hat man drei Theorien aufgestellt: die chemische, die mechanische und die Lösungstheorie.

Die chemische Theorie nimmt an, daß zwischen den Farbstoffen und der Substanz der Faser eine chemische in Wasser unlösliche Verbindung entsteht. Nun lassen sich aber keinerlei Beziehungen zwischen der Menge des angewandten Farbstoffes und der Menge der vorhandenen Faser feststellen; höchstens 5% Farbstoff werden aufgenommen.

Die mechanische Theorie versucht die Färbung durch Adsorption zu erklären.

Die Lösungstheorie stammt von Otto N. Witt. Die Fasern bestehen aus kolloidalen Substanzen. Zwischen ihnen und den Farblösungen tritt Osmose ein. Je nach der Lösungsdifferenz zwischen der Faser und dem Farblösungsmittel wird eine stärkere oder schwächere Färbung eintreten. Je größer die Löslichkeit des Farbstoffes in der Substanz der Faser ist, desto intensiver ist die Färbung und entsprechend ist sie auch desto waschechter.

Die chemische Theorie der Färbung ist also keineswegs allgemein anerkannt; die physikalische Theorie besitzt sogar eine größere Wahrscheinlichkeit, wenn es auch nicht ausgeschlossen ist, daß beide Faktoren bei der Färbung eine Rolle spielen. Auf alle Fälle sind wir nicht berechtigt, die Färbung mit basischen Farbstoffen als eine mikrochemische Reaktion anzusehen.

Zacharias behauptete 1898: „Die Entscheidung der Frage, ob die im Kern auftretenden Färbungen auf der Bildung „chemischer Verbindungen“ beruhe oder nicht, ist für die Entscheidung über die Brauchbarkeit der Färbungen als Erkennungsmittel für bestimmte Stoffe nicht von ausschlaggebender Bedeutung.“

Das wäre richtig, wenn wir tatsächlich in den basischen Farbstoffen ein Mittel besäßen, durch welches das Chromatin und nur das Chromatin jederzeit gefärbt würde; denn dann könnten diese Kernfarbstoffe als einwandfreies Diagnostikum für das Chromatin gelten, wobei es ganz gleichgültig bliebe, ob der Farbstoff chemisch gebunden oder auf physikalischem Wege durch Adsorption festgehalten würde.

Keine Farbreaktion auf das Chromatin ist ganz einwandfrei. Durch die Fixierungen werden noch ganz andere Adsorptionsverhältnisse geschaffen, infolge deren sich das Chromatin, bezw. die Chromosomen den Farbstoffen gegenüber abweichend verhalten. So können die gleichen Zellbestandteile ein verschiedenes färberisches Verhalten zeigen. Wir sind nicht berechtigt, aus dem Auftreten einer Färbung mit den sogenannten Kernfarbstoffen auf die Anwesenheit des Chromatins zu schließen.

Wenn nur ganz geringe Unterschiede in der vorherigen Behandlung vorkommen, können wir oft ganz abweichende Resultate erzielen. Bisweilen hängen diese von unbedeutenden Nebenumständen ab, die wir kaum vorher beachten können. Auf alle Fälle muß man die Färbungsmethoden stets mit peinlichster Gewissenhaftigkeit anwenden.

Fischer hat gezeigt, wie außerordentlich wichtig eine gründliche

Auswaschung nach der Fixierung ist; denn sonst können noch geringe Niederschläge vorhanden sein, die die Färbbarkeit der Objekte sehr stark beeinträchtigen.

Auch jene Tatsache fand bereits Erwähnung, daß sich die Dottersubstanzen genau ebenso mit den Kernfarbstoffen färben, wie das Chromatin, und daß sie sich einigen Reagentien gegenüber in gleicher Weise verhalten, obwohl wir chemisch ganz verschiedene Stoffe vor uns haben.

Alle diese Tatsachen zeigen uns zur Genüge, daß wir keinen einzigen Farbstoff besitzen, der uns ganz einwandfrei über die Anwesenheit von Chromatin Auskunft geben kann, geschweige denn, daß wir bisher imstande wären, mit Hilfe der Färbungsmethoden in den feineren, chemischen Aufbau der Zellkerne einzudringen.

Nach diesem Ergebnisse ist die Definition des Chromatins von Flemming, auch in der abgeänderten Form nicht mehr haltbar. Eine chemische Definition läßt sich bei dem heutigen Stande unserer Kenntnisse nicht geben. Wir müssen eine andere, rein morphologische Definition aufstellen. Doflein sieht als Chromatin nur dasjenige an, welches sich in irgendeiner Weise aus Chromosomen ableiten läßt. Hierbei wäre es allerdings noch möglich, daß in den Chromosomen irgend welche Gerüstsubstanzen enthalten sind, die für das eigentliche Chromatin keine Bedeutung besitzen. Gerade die modernen Untersuchungen der Kernteilungen bei Protozoen bestärken uns immer mehr in der Annahme, daß die mitotische Kernteilung die ursprüngliche ist, da schon die einfachsten Protisten eine deutliche mitotische Kernteilung aufweisen, bei denen also in irgendeinem Stadium mehr oder weniger ausgeprägte Chromosomenindividuen vorkommen. Die wenigen noch bekannten Fälle amitotischer Kernteilung werden sich vielleicht zum Teil bei eingehenderer Untersuchung mit den modernen Hilfsmitteln auch noch als mitotische erweisen, oder aber es handelt sich um degenerative Formen der Zellteilung. In den meisten Fällen wird es möglich sein, das Chromatin auch des ruhenden Kerns von den Chromosmen abzuleiten. Doch führen uns diese Fragen von unserem eigentlichen Thema ab.

Die Bedeutung der Färbungsmethoden für die Chemie des Zellkerns ist, wie wir sahen, außerordentlich gering. Trotz dieses negativen Ergebnisses verlieren die Färbemethoden in der mikroskopischen Technik nicht an Bedeutung. Denn um die morphologischen Einzelheiten und Feinheiten in den Zellen aufzudecken, können wir die Färbetechnik nicht entbehren; und allein mit ihrer Hilfe ist es der Cytologie gelungen, den feineren morphologischen Aufbau des Protoplasmas und der Zellkerne zu analysieren.

Da man mit den Färbungsmethoden zu keinem Resultate gekommen ist, näheren Aufschluß über die chemische Beschaffenheit des Zellkerns zu erlangen, hat man versucht, durch andere Methoden das Problem der Lösung näher zu bringen.

Wir kommen zu den eigentlichen mikrochemischen Untersuchungsmethoden. Diese wollen durch bestimmte chemische Reaktionen, durch Fällungen oder Lösungen die An- oder Abwesenheit bestimmter Elemente oder Verbindungen innerhalb der Zelle nachweisen. Diese Methoden müssen selbstverständlich außerordentlich fein und genau sein, da ja innerhalb der Zelle und Gewebe nur sehr geringe Mengen der betreffenden Stoffe zur Verfügung stehen. Weiter müssen wir von den mikrochemischen Methoden fordern, daß die Reaktionen unter dem Mikroskop verfolgt werden können.

Zunächst hat man versucht, bestimmte Elemente in den Kernen nachzuweisen. Die wichtigsten Methoden und Resultate wollen wir kurz besprechen.

Macallum machte Untersuchungen über die Verbreitung des Eisens in den Zellkernen. Das Eisen soll meist im maskierten Zustand in den Zellen vorhanden sein, d. h. in organisch gebundener Form, in der es ohne weiteres nicht nachgewiesen werden kann. Häufig muß es vorher durch Einwirkung von saurem Alkohol aufgeschlossen werden und das organische Eisen extrahiert werden.

Nach Einwirkung einer Mischung von gleichen Teilen von Ammoniumthiohydrat (NH_4SH) und 50 % Glyzerin kann das Eisen mikroskopisch nachgewiesen werden. Nach dieser Methode fand Macallum in dem Chromatingerüst der Tier- und Pflanzenkerne Niederschläge von Schwefeleisen (Ferrosulfid), die den Strukturen eine grünliche bis grünschwarze Färbung verleihen. Daneben trat die Eisenreaktion teilweise auch in anderen Zellbestandteilen auf.

Es ist sehr leicht möglich, daß das Eisen im Chromatin nur gespeichert wird. Es kann aus irgendwelchen zusammengesetzten Reagentien stammen, da die Nukleinsäure imstande ist, auch solche anorganische Eisensalze zu maskieren. Schließlich könnte das Eisen in der Wand der benutzten Glasgefäße seinen Ursprung haben. Macallum suchte nach Möglichkeit diese Fehlerquellen auszuschalten.

Masing untersuchte Seeigelsperma und fand nur Spuren von Eisen, die er als Verunreinigungen auffaßt. Sauerland machte quantitative Untersuchungen an nukleinsaurem Natron aus Kalbsthymus und an freier Nukleinsäure aus dem Heringssperma. Auch er fand nur so geringe Mengen Eisen, daß sie nicht einmal einem Atom Fe im Molekül der Nukleinsäure entsprechen. Steudel's Ansichten über den Aufbau der Nukleinsäure lassen das Fehlen des Eisens schon erwarten. Sauerland erhielt aber auch in einem Präparat von Pankreas-Nukleoproteid nur einen so geringen Ausfall der Ferrocyankalium- und Rhodankalium-Probe, daß eine quantitative Bestimmung gar nicht vorgenommen werden konnte. So kommen Masing und Sauerland zu der Auffassung, daß die Nukleoproteide, vielleicht sogar die ganzen Zellen eisenfrei sind. Sie benutzten beide die Methode der Veraschung.

Kupfer findet sich in den Zellkernen und zwar wahrscheinlich

in Verbindung mit den Nukleoproteiden. Es wurde im Protoplasma von Mollusken und Crustaceen und in der Leber von Cephalopoden und Wirbeltieren nachgewiesen. Wahrscheinlich kommt es in maskierter Form vor. Über die nähere Verteilung des Kupfers in den Tier- und Pflanzenzellen ist bisher noch nichts Sicheres bekannt.

Der Phosphor kommt in den lebenden Zellen entweder in anorganisch gebundener Form vor, in der er leicht nachgewiesen werden kann, oder aber in maskierter Form, aus der er erst durch Einwirkung kräftiger chemischer Reagentien frei gemacht werden kann. Die Verteilung des Phosphors in der Zelle kann vermittels Ammoniummolybdat in salpetersaurer Lösung nachgewiesen werden. Pyrogallol und salzsaures Phenylhydrazin werden als Reduktionsmittel verwandt, durch die bei Gegenwart von Phosphor ein blau-grünes Reduktionsprodukt entsteht.

Das Chromatin gibt stets eine deutliche Phosphorreaktion; die Nukleolen reagieren sehr viel geringer als das Chromatin. Diese Resultate stimmen mit den makrochemischen Untersuchungen überein, welche uns gezeigt haben, daß in der Nukleinsäure eine Phosphorsäure enthalten ist. Es ist allerdings bezweifelt worden, daß diese Reaktion für das Vorhandensein von maskiertem Phosphor beweisend ist. Dagegen scheint festzustehen, daß in den Tier- und Pflanzenkernen keine anorganische Phosphate vorhanden sind.

Das Calcium kann durch die Purpurinreaktion von Grandis Mainani nachgewiesen werden, die allerdings nicht sehr empfindlich ist. Die empfindlichste Mikroreaktion ist die Behandlung mit Ammoniumsulfat. Weite Verbreitung gefunden hat die Hämatoxylinmethode: Die Präparate werden 20 Minuten mit einer 2 % alkoholischen Schwefelsäurelösung behandelt und dann in eine 1 % Hämatoxylinlösung gebracht, wodurch an den Stellen, wo das Calciumsulfat vorhanden ist, eine tiefrote Färbung eintritt. Diese Färbung ist jedoch nicht haltbar, sondern verbreitet sich nach wenigen Minuten durch das ganze Präparat. Außer diesen gibt es noch eine Reihe anderer Methoden, um Calciumverbindungen in den Geweben nachzuweisen.

Durch Anwendung dieser Methoden hat man gefunden, daß das Cytoplasma mit Ausnahme der Nervenzellen stets Calciumverbindungen enthält, welche den Kernen fehlen sollen. Nach Loew sollen allerdings auch in den Kernen Calciumsalze vorkommen und zwar in Verbindung mit den Eiweißkörpern. Miescher fand in den Köpfen der Spermatozoen bis 0,23 % Calcium. Es ist wahrscheinlich, daß es in anorganischer Bindung in der Membran vorhanden ist.

Um Kalium mikrochemisch sichtbar zu machen, benutzt man die Kobaltkaliumnitrit-Reaktion. Man löst Kobaltnitrit und Natriumnitrit in verdünnter Essigsäure. Dieses Reagenz gibt mit einer Kaliumsalzlösung einen orangegelben Niederschlag, dessen Kristalle eine charakteristische Form und Farbe besitzen. Macallum fand, daß keinerlei Kaliumsalze in den Kernen vorhanden sind, während sie im Cytoplasma reichlich auftreten.

Die Chloride lassen sich außerordentlich leicht in den Geweben nachweisen, indem man sie mit Silbernitrat und Salpetersäure behandelt. Wenn man dieses Präparat dem Licht aussetzt, erhält man eine deutliche Schwarzfärbung.

Mit dieser Methode stellte Macallum fest, daß die Kerne der tierischen und pflanzlichen Zellen im normalen Zustand frei von Chloriden sind.

Für den Nachweis von Natrium, Magnesium, Sulfat- und Karbonationen fehlen bis jetzt geeignete mikrochemische Methoden, so daß über ihre Verbreitung in den Zellkernen nichts Näheres angegeben werden kann.

Macallum vertritt nach seinen bisherigen Ergebnissen die Ansicht, daß die Kerne vollkommen salzfrei sind und baut hierauf eine besondere Vererbungstheorie auf.

Außer die Verbreitung der einzelnen Elemente aufzuklären, hat man sich vor allem bemüht, das Vorhandensein bestimmter Eiweißkörper und ihrer Spaltungsprodukte in den Kernen nachzuweisen und festzustellen, aus welchen Eiweißverbindungen die einzelnen morphologischen Bestandteile des Kerns bestehen. Hierzu gibt es zwei Methoden: die fällungsanalytischen und die lösungsanalytischen.

Die Fällungsmethoden spielen in der Makrochemie eine große Rolle und gerade in der Eiweißchemie sind sie von besonderer Bedeutung. Im Gegensatz hierzu besitzen wir aber fast keine einzige brauchbare mikrochemische fällungsanalytische Methode.

Alfred Fischer machte 1899 Angaben über eine mikrochemische Fixierungsanalyse. Er behauptet, daß man durch Anwendung verschiedener Fixierungsmittel mit nachfolgender Färbung wenigstens das Vorhandensein von Albumosen und von reiner Nukleinsäure nachweisen könne. Wir haben Fällungsreaktionen vor uns. Das Prinzip der fixierungsanalytischen Albumosereaktion ist nach Fischer: „Anwendung einerseits von Fixierungsmitteln, die die Albumose entweder gar nicht oder wasserlöslich fällen, so daß in ausgewaschenen und gefärbten Schnitten nichts mehr zu sehen ist, andererseits mit solchen Fixierungsmitteln, die unlösliche Granula geben."

Zum Nachweis der Albumose brauchte man nur mit einem Fixierungsmittel zu fixieren, das die Albumose als Granula fällt, wie z. B. ein Osmium-Essigsäuregemisch, und mit einem Fixierungsmittel, bei dem die Albumose in Lösung bleibt, am besten mit Alkohol. Hinterher kann man noch mit Säurefuchsin färben und wird dann beim Osmiummaterial rote Granula finden, beim Alkoholmaterial dagegen nichts. Als Kontrollmittel lassen sich hinterher noch lösungsanalytische Methoden anwenden: Die Albumosegranula muß sich in Kaliumpermanganat und Salzsäure, Oxalsäure, heißem Wasser lösen.

Ähnlich gestaltet sich der Nachweis freier Nukleinsäure: Durch ein Osmiumsäuregemisch entstehen „Granula oder knorrige, chromosomenähnliche Bildungen", welche ausgesprochen acidophob sind, d. h.

daß alle sauren Anilinfarben verschmäht werden. Zum Nachweis der Nukleinsäure verwendet man am besten einfache Lösungen saurer Farben, kein Gemisch aus sauren und basischen, welche hierzu ungeeignet sind. Nach Imprägnation der Schnitte mit 5% Albumose erhält man mit saurem Farbstoff eine lebhafte Färbung der acidophoben Granula. Durch Alkohol tritt keine Fällung ein.

Nach Fischer gelingt der Nachweis aber nur für reine Nukleinsäure. Ist eine Mischung mit Albumosen oder einem anderen Eiweißstoff vorhanden, so erhalten wir eine Färbung mit den sauren Farbstoffen. Da nun aber, wie wir im ersten Teil unserer Auseinandersetzungen gesehen haben, im Zellkern neben der Nukleinsäure stets auch Eiweißstoffe vorhanden sind, ist diese fällungsanalytische Methode nicht geeignet, in den mikrochemischen Aufbau der Kerne näher einzudringen.

So bleiben uns als letztes Mittel mikrochemischer Untersuchung des Zellkerns die lösungsanalytischen Methoden. Auch sie beziehen sich lediglich auf verschiedene Eiweißstoffe und die Nukleinsäure. Genau genommen hat man mit ihrer Hilfe bisher nur versucht, festzustellen, ob in den einzelnen Strukturelementen Nukleoproteide vorhanden sind oder nicht.

Man müßte unterscheiden zwischen rein mikrochemischen Reaktionen und mehr morphologischen. Die mikrochemischen suchen festzustellen, ob und wo bestimmte makrochemisch gut charakterisierte Stoffe in den Kernen vorkommen; während die morphologischen sich darauf beschränken, klarzulegen, wo morphologisch definierte Stoffe, wie z. B. das Chromatin, Linin u. s. w. in den einzelnen Kernelementen lokalisiert sind.

Eine scharfe Trennung zwischen beiden Methoden läßt sich aber nicht durchführen. Manche Autoren identifizieren direkt die Begriffe Chromatin und Nukleoproteide, was sicher nicht berechtigt ist, da auf alle Fälle neben den Nukleoproteiden noch andere Stoffe in den Chromatingebilden vorkommen. Die morphologischen Methoden verwenden auch chemische Reaktionen und Lösungsmittel zur Analyse; andererseits hat es die Mikrochemie mit bestimmt gestalteten Gebilden und Verbindungen zu tun.

Die meisten Stoffe kommen in den lebenden Zellen im flüssigen oder kolloidalen Zustand vor. In diesem Zustand können Lösungsmittel, insbesondere Wasser nicht ohne weiteres wirken, bezw. ihre Wirksamkeit sichtbar gemacht werden. Aus diesem Grunde haben die meisten Autoren vor Anwendung der Lösungsmittel die Eiweißstoffe des Kerns gefällt. Sie benutzten hierzu möglichst indifferente, gelinde Fixierungsmittel, meist reinen Alkohol oder sehr verdünnte Essigsäure. Die Einwirkung darf nicht zu lange dauern, im allgemeinen nicht über 24 Stunden, da sonst die Löslichkeitsverhältnisse durch die lange Fixierung stark verändert werden. Trotzdem ist es nützlich zum Vergleich auch frisches Material zu verwenden. Zacharias hat in seinen zahlreichen Untersuchungen häufig neben dem frisch

konservierten Material auch lebende Zellkerne verwendet. In neuester Zeit hat R. Groß ebenfalls die Löslichkeitsverhältnisse der Strukturelemente an verschiedenen lebenden Kernen näher untersucht.

Zu den mikrochemischen Untersuchungen benutzt man meistenteils Methoden, die auch in der Makrochemie verwendet werden. Selbstverständlich müssen diese den besonderen Verhältnissen der mikroskopischen Kleinheit angepaßt und entsprechend verändert werden.

Es gibt nicht sehr viele Forscher, die sich auf diesem Gebiet der mikroskopischen Analyse betätigt haben; es waren vor allem der Zoologe Carnoy und die Botaniker Frank Schwarz und E. Zacharias, der sehr zahlreiche und eingehende Untersuchungen über diesen Gegenstand veröffentlicht hat.

In unserem ersten Hauptabschnitt haben wir bereits gesehen, daß man Pepsin-Salzsäure dazu benutzt, um die Nukleoproteide in Nukleine und Nukleinsäuren zu spalten. Die Nukleine und Nukleinsäuren dagegen zeichnen sich dadurch aus, daß sie durch Pepsin-Salzsäure nicht angegriffen und verdaut werden. Anstelle der Pespin-Salzsäure kann man auch sogenannten „künstlichen Magensaft" verwenden, den man aus Glyzerinextrakt aus einem Schweinemagen herstellt, dem man noch etwa die dreifache Menge von 0,28 % Salzsäure zusetzt. Zacharias wandte diese makrochemisch bekannten Mittel auf die mikrochemische Untersuchung der Zellkerne an. Dieser künstliche Magensaft muß längere Zeit (etwa 24 Stunden) bei 32°—50° C auf das zu untersuchende Objekt einwirken. Nach der Verdauung erscheinen die nukleinhaltigen Teile, insbesondere die Chromatinkörner scharf konturiert und stark lichtbrechend. Sie werden stark glänzend und treten scharf hervor. Ihre Unlöslichkeit scheint für eine Nukleinnatur des Chromatins zu sprechen. Während das Kernnuklein durch Pepsinsalzsäure oder künstlichen Magensaft nicht gelöst wird und auch nicht quillt, zeigen andere Stoffe, besonders die Nukleolen, die Grundmasse des Zellkerns und das Protoplasma eine deutliche Quellung.

Schwarz untersuchte die Wirkungsweise des Trypsins auf die Zellkerne. Er fand, daß das Chromatin durch Trypsin außerordentlich leicht verdaut wird und in Lösung geht, meist bereits nach 5—10 Minuten. Im Gegensatz hierzu bleiben die Nukleolen sehr lange erhalten; schließlich wird aber der ganze Kern vom Trypsin aufgelöst.

Außer diesen Verdauungsversuchen wurde von Zacharias noch eine Anzahl von Lösungsversuchen mit anderen Lösungsmitteln unternommen, mit Säuren, Alkalien und Salzlösungen. Teils untersuchte er frische und frisch konservierte Kerne, zum Teil setzte er diese erst einer Verdauung im künstlichen Magensaft aus und ließ dann erst die anderen Lösungsmittel auf die Verdauungsreste einwirken.

Zacharias benutzte zu diesen Versuchen sowohl das klassische Objekt von Miescher, die Lachsspermatozoenköpfe, als auch einige botanische Objekte, besonders Zellen aus der Epidermis der *Phajus-*

Knollen und Wurzeln. In einzelnen Fällen wurde nur Alkoholmaterial, in anderen nur frisches, häufig aber beides geprüft.

Ich habe eine Tabelle zusammengestellt, die die wichtigsten der von Zacharias erhaltenen Reaktionen enthält. Dabei muß ich bemerken, daß er in einzelnen Fällen, je nach dem verwandten Objekt oder je nach der Vorbehandlung etwas abweichende Resultate erhielt.

Zacharias hat es absichtlich unterlassen, eine solche Tabelle zusammenzustellen, „da nur aus einer eingehenden Beschreibung des

	Chromatin	Nukleolen	Grundmasse des Kerns	Protoplasma
1. künstl. Magensaft Pepsinsalzsäure	quillt nicht stark lichtbrechend	quillt teilweise gelöst	quillt	quillt aber ungelöst
2. HCl 0,1 bis 0,3 %	quillt nicht stark lichtbrechend	quillt	quillt	quillt
3. HCl 4:3	gelöst	nicht gelöst	nicht gelöst	quillt nicht
4. NaCl 10 %	quillt	quillt nicht	quillt nicht	quillt nicht
5. Na_2SO_4 10 %	quillt	quillt nicht	quillt nicht	quillt nicht
6. Na_2CO_3 je nach Konzentration	quillt oder gelöst	später als Chromatin gelöst	gelöst	quillt oder gelöst
7. KOH $^1/_2$ %	gelöst	später als Chromatin gequoll. u. gelöst	quillt	gelöst
8. destilliertes Wasser	quillt ohne Lösung	quillt nicht	—	—
9. H_2O 100,0 Na_2SO_4 10,0 CH_3COOH 1,0 Fuchsin-S. 0,1	quillt ohne Färbung	quillt nicht Rotfärbung	—	—
10. Methylenblau + Fuchsin-S. (nach 0,3 % HCl)	blau	rot	rot	rot
11. Methylgrün-Essigsäure	grün ohne Quellung	färbt nicht	färbt nicht	—
12. Essigkarmin (Schneider)	rot ohne Quellung	quillt ohne Färbung	keine Färbung	verschwommene Färbung
13. ammoniakal. Karminlösung	quillt	quillt nicht rot	—	—

Verlaufs der mikrochemischen Reaktionen die zur Kennzeichnung und Unterscheidung der hier in Betracht kommenden Stoffe maßgebenden Eigentümlichkeiten entnommen werden können". Mir kommt es hier aber lediglich auf eine übersichtliche Zusammenstellung der bisherigen Ergebnisse an. Daß derjenige, welcher selbst auf diesem Gebiete arbeiten oder ein selbständiges Urteil über diese Dinge fällen will, sich in die ausführliche Darstellung der einzelnen Versuche hineinvertiefen muß, dürfte wohl selbstverständlich sein.

Zur Ergänzung füge ich noch eine Tabelle nach Schwarz an:

	Chromatin	Linin (Gerüstsubstanz)	Pyrenin (Nukleolus)
NaCl 10 %	löslich	löslich	löslich
NaCl 20 %	löslich	quellend	unlöslich
$MgSO_4$ konz.	löslich	unlöslich	unlöslich
KH_2PO_4 1—5 %	löslich	unlöslich	unlöslich
KOH 0,1 %	löslich	löslich	schwer löslich
CH_3COOH 1 %	gefällt	gefällt	gefällt
CH_3COOH 3 %	gefällt	gefällt	quellend
HCl 0,1 %	unlöslich	unlöslich	unlöslich
HCl 1 %	unlöslich	unlöslich quellend	quellend löslich
HCl konz.	unlöslich	unlöslich	unlöslich
$K_4Fe(CN)_6 + CH_3COOH$	löslich	unlöslich	gefällt
$CuSO_4$ konz.	langs. löslich	unlöslich gefällt	unlöslich gefällt
Pepsinwirkung	nicht verdaubar	nicht verdaubar	nicht verdaubar partiell gelöst
Trypsinwirkung	sehr l. verdaubar	verdaubar	teilw. schw. verdaub.

Ich möchte hinzufügen, daß diese Resultate großen Widerspruch gefunden haben und von dem Botaniker Zimmermann eingehend kritisiert worden sind.

Nur dort, wo wir makrochemisch ausgearbeitete Methoden auf die Mikrochemie anwenden können, oder wo uns doch wenigstens die Makrochemie gewisse Richtlinien und Vergleichspunkte gibt, konnten einigermaßen brauchbare Resultate erzielt werden. Wenn man aber versucht, makrochemisch noch unbekannte Stoffe und Bestandteile mikrochemisch zu analysieren, ist man doch allzu sehr auf reine Vermutungen angewiesen. So versuchten Zacharias und Carnoy die

nach Pepsinverdauung und alkalischer Extraktion zurückbleibenden schwer löslichen Zellbestandteile, das sogenannte Plastin, aus dem das Kerngerüst besteht, mit einem von Miescher dargestellten Nuklein zu identifizieren.

Auch die Nukleolen konnten bisher noch nicht makrochemisch untersucht werden, da ihre Masse zu gering ist. Schon der Begriff der Nukleolen ist außerordentlich schwankend. Die verschiedenartigsten Gebilde werden unter diesem Namen zusammengefaßt. Die einen Autoren verstehen darunter chromatische Binnenkörperchen des Kernes (Karyosomen), während andere Autoren den Namen der Nukleolen allein auf achromatische Gebilde beschränkt wissen wollen. Nun ist sicher die Frage, ob in bestimmten Nukleolen chromatische Substanz vorhanden ist oder nicht, eine der wichtigsten.

In dem Abschnitt über das Verhalten der Kerne gegenüber den Anilinfarbstoffen haben wir schon gesehen, wie schwer einwandfreie Farbreaktionen zu erzielen sind, und daß sie uns keineswegs berechtigen, daraus irgendwelche Schlüsse auf die chemische Natur der Körper zu ziehen. So können uns auch die Farbreaktionen nichts Sicheres darüber aussagen, ob in den Nukleolen Chromatin vorhanden ist oder nicht. Noch etwas eher würden die oben dargestellten Lösungsversuche, insbesondere die künstliche Verdauung durch Pepsin-Salzsäure uns einige Aufschlüsse über diese Frage zu geben imstande sein.

Die Nukleolen zeigen den Anilinfarben gegenüber ein acidophiles Verhalten. Künstliche Verdauung durch Pepsin-Salzsäure bringt sie teilweise zur Lösung, während sie in Kochsalzlösung, starker Salzsäure und alkalischen Salzlösungen sehr wenig oder gar nicht löslich sind. Alles dieses spricht sehr dafür, daß wir keine größeren Mengen von Nukleoproteiden vor uns haben. Aber auch hier sind wir bei unseren geringen mikrochemischen Kenntnissen auf sehr weitgehende Analogieschlüsse angewiesen.

Um Aufschluß über die Natur der Nukleolen in den einzelnen Fällen zu erhalten, müßte man ihr morphologisches Verhalten in den verschiedenen Stadien der Kernteilung näher untersuchen und feststellen, ob sich ev. die Nukleolen aus den Chromosomen oder chromatischen Bestandteilen des Zellkernes bilden, bezw. umgekehrt oder sonst in irgendeiner Beziehung zu ihnen stehen. Diese morphologischen Betrachtungen gehören aber nicht zu unserem Thema.

Richard Groß, ein Schüler Brüel's hat in neuester Zeit Untersuchungen veröffentlicht, bei denen er die Lösungsversuche von Zacharias und Carnoy auf lebende Zellkerne anwandte. Er benutzte destilliertes Wasser, konzentrierte Salzsäure, 5 % Ammoniak, 10 % Sodalösung und 10 % Kochsalzlösung. Er erhielt ganz andere Resultate als Zacharias. Die Chromatinkörner zeigten in ihrem Verhalten gegenüber den Lösungsmitteln in demselben Kerne häufig starke Verschiedenheiten. Die chromatischen Netzknoten wurden leicht

gequollen und gelöst, während die Oxychromiolen nicht beeinflußt wurden; nur konzentrierte Salzsäure griff sie an.

Ein ganz abweichendes Verhalten zeigten die Nukleolen der frischen Zellkerne. Während Zacharias und Carnoy nachgewiesen hatten, daß die mit gelinden Fixierungsmitteln konservierten Nukleolen sich dadurch auszeichnen, daß sie eine große Widerstandsfähigkeit gegen verdünnte Alkalien, Kochsalzlösungen und Salzsäure besitzen, und daß sie durch diese Lösungsmittel nicht zur Quellung gebracht werden, fand Groß, daß der frische Nukleolus überall gelöst wurde, wenn nur die Reagentien genügend lange einwirkten. Nach älteren Autoren müßte man aus diesem Verhalten der Nukleolen auf ihre chromatische Natur schließen. Nun konnte Groß aber zeigen, daß sich gerade der chromatische Nukleolus des *Anodonta*-Eies in den Chromatin-Lösungsmitteln viel weniger leicht löst, als andere Nukleolen, und daß in demselben Kern häufig die Nukleolarsubstanz rascher gelöst wird als das Chromatin oder Chromogranula. Dieses abweichende Verhalten der Nukleolen ist vielleicht durch eine größere Diffusionsgeschwindigkeit ihrer gelösten Substanz im Kernsaft zu erklären.

Zu bedauern ist, daß Groß nicht zur Kontrolle Verdauungsversuche mit Pepsin-Salzsäure und Lösungsversuche an konservierten Zellkernen gemacht hat, bei denen die Eiweißstoffe gefällt sind, also unter den gleichen Versuchsbedingungen, wie sie die älteren Autoren angewandt haben.

Diese verschiedenen Ergebnisse von R. Groß haben die Resultate von Zacharias und Carnoy wieder höchst problematisch gemacht. Es scheint wieder unmöglich geworden zu sein, verdünnte Alkalien, Salzlösungen und Salzsäure als lösungsanalytische mikrochemische Reagentien anzuwenden. Unbedingt bedürfen jetzt die Lösungsversuche, vor allem an konservierten Zellkernen einer neuen eingehenden Nachprüfung.

Als einziges Lösungsmittel, das jetzt noch für den mikroskopischen Nachweis der Nukleoproteide in Betracht käme, bleibt uns vorläufig die Verdauung mit Pepsin-Salzsäure. Aber auch hierbei muß man in Erinnerung behalten, daß die Phosphorproteide, also die Dottersubstanzen sich der Pepsin-Salzsäure gegenüber ganz ähnlich verhalten.

Betrachten wir einmal das Gesamtergebnis unserer vorangehenden Auseinandersetzungen: Der Makrochemie ist es gelungen, gewisse Eiweißkörper zu isolieren und ihre chemische Konstitution nachzuweisen; es handelt sich um Verbindungen von Eiweißstoffen mit der Nukleinsäure. Daß diese Nukleoproteide, Nukleine und Nukleinsäuren in den Zellkernen vorkommen, dürfte wohl einwandfrei nachgewiesen sein; aber höchst wahrscheinlich kommen außer ihnen noch andere Verbindungen in den Zellkernen vor, über deren chemische Beschaffenheit und Aufbau wir noch keinerlei Kenntnis haben. Vor allem ist es bisher noch nicht gelungen, klarzulegen, wie die einzelnen

Strukturelemente des Zellkernes, die Chromosomen, die Nukleolen, das Kerngerüst u. s. w. im besonderen chemisch aufgebaut sind.

Die Färbungsmethoden haben sich als ungeeignet erwiesen, uns über die chemische Konsistenz der Objekte etwas Näheres auszusagen. Höchstens kann man nachweisen, ob die betreffenden Kernbestandteile basischen oder sauren Charakter besitzen; wodurch aber nichts darüber gesagt ist, ob die saure Beschaffenheit auf die Anwesenheit der Nukleinsäure zurückzuführen ist oder ob nicht andere Stoffe die Ursache bilden. Selbst diese Reaktion auf Säuren und Basen wird wieder zweifelhaft, wenn wir erfahren, daß wenigstens zum großen Teil, nicht chemische Verbindungen sondern physikalische Gesetze die Ursache der Färbung darstellen. Wir können die Färbungsmethoden nicht als mikrochemische Reaktion verwenden.

Die Mikroanalyse hat ergeben, daß höchstwahrscheinlich sämtliche Salze den Kernen fehlen. Die fällungsanalytischen Methoden haben uns unserem Ziele kaum näher gebracht. Eine größere Bedeutung haben die lösungsanalytischen Methoden. Vom künstlichem Magensaft wird das Chromatin nicht angegriffen. Versuche mit Alkalien, verdünnten Salzlösungen und Säuren haben zum Teil widersprechende Ergebnisse gebracht, die erst noch einer neuen Nachprüfung bedürfen.

Wir besitzen keine wirklich einwandfreie mikrochemische Reaktion, die uns über den Aufbau und die nähere Lokalisation der Eiweißkörper in den Zellkernen etwas Näheres aussagte. Die positiven Resultate sind also außerordentlich gering.

Vielleicht wird dieses negative Ergebnis manchen Cytologen bestimmen, sich noch mehr als bisher der Chemie, insbesondere der Mikrochemie der Zelle gegenüber ablehnend zu verhalten. Das ist aber vollkommen unberechtigt. Auf diese Weise kommen wir nicht weiter. Die Probleme sind einmal da; und so müssen sie gelöst werden.

Sicherlich müssen in der Makrochemie erst noch sehr bedeutende Fortschritte gemacht werden, bevor die Mikrochemie der Zelle Aussicht hat, mit größerem Erfolge zu arbeiten.

Trotzdem dürfen wir auch jetzt nicht die Probleme einfach ignorieren oder beiseite liegen lassen. Denn es handelt sich um Fragen, die für den Cytologen von ausschlaggebender Bedeutung sind. Deshalb sind wir verpflichtet, weiter zu forschen, und da, wo wir mit den bisherigen Methoden nicht weiter kommen können, nach neuen, bisher unbekannten Forschungsmethoden zu suchen, um das Problem der Lösung näher zu bringen.

Literatur.

Nähere Literaturangaben über die Makrochemie und über das Vorkommen der einzelnen Elemente siehe bei Cohnheim 1911 und 1913, Kanitz 1910, Macallum 1908 und Zacharias 1909.

Altmann, R., Über Nukleinsäuren. In: Arch. f. Anat. u. Physiol., Abt. Physiol. 1899.

Auerbach, L., Zur Kenntnis der tierischen Zellen I: Über zweierlei chromatophile Kernsubstanzen. In: Sitzungsber. d. Kgl. preuß. Akad. d. Wiss. 1890.
— Über einen sexuellen Gegensatz der Keimsubstanzen u. s. f. In: Sitzungsber. d. Kgl. preuß. Akad. d. Wiss. 1891.
Bang, I., Biochemie der Zellipoide I u. II. In: Asher und Spiro, Ergebnisse der Physiol. Bd. 6 u. 8. 1907, 1909.
Berg, W., Beiträge zur Theorie der Fixation mit besonderer Berücksichtigung des Zellkerns und seiner Eiweißkörper. In: Arch. f. mikroskop. Anat. Bd. 62. 1903.
— Weitere Beiträge zur Theorie der histologischen Fixation. (Versuche an nukleinsaurem Protamin). In: Arch. f. mikroskop. Anat. Bd. 65. 1904.
Boveri, Th., Ergebnisse über die Konstitution der chromatischen Substanz des Zellkerns. Jena 1904.
Brüel, L., Zelle und Zellteilung (Zoologisch). In: Handwörterb. d. Naturwiss. Bd. 10. Jena 1915.
Burian, R., Chemie der Spermatozoen I u. II. In: Asher u. Spiro, Ergebn. d. Physio. Bd. 3 u. 5. 1904. 1906.
Carnoy, J. B., La biologie cellulaire. Lierre 1884.
Carnoy u. Lebrun, La vésicule germinative et les globules polaires chez les Batraciens. In: La Cellule. T. 12. 1897.
Cohnheim, O., Chemie der Eiweißkörper. 3. Aufl. Braunschweig 1911.
— Eiweißkörper. In: Handwörterb. d. Naturwiss. Bd. 3. 1913.
Doflein, F., Beiträge zur Kenntnis von Bau und Teilung der Protozoenkerne. I. Die Kernteilung von Polytomella agilis Aragao. In: Zool. Anz. Bd. 49. 1918.
— Studien zur Naturgeschichte der Protozoen. X. Über Polytomella agilis Aragao. In: Zool. Jahrb. Bd.41. Abt. f. Anat. 1918.
Ehrlich, P., Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten. In: Zeitschr. f. klin. Med. 1. Bd. 1880.
— Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes. Berlin 1891.
Enzyklopädie der mikroskopischen Technik, herausgeg. von P. Ehrlich u. a. 1. Aufl. 1903. 2. Aufl. 1910; darin: Magnus, Zellchemie; Heidenhain, Allgemeine Methode der histologischen Färbungen; Heidenhain, Theorie der histologischen Färbung (1. Aufl.); Michaelis, Theorie der histologischen Färbungen (2. Aufl.); Witt, O. N., Färbung (Techn. Färberei); Fischel, Vitale Färbung; Spalteholz, Künstliche Verdauung.
Fischer, A., Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasma. Jena 1899.
Flemming, W., Beobachtungen über die Beschaffenheit des Zellkerns. In: Arch. f. mikrosk. Anat. Bd. 13. 1876.
— Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen I—III. In: Arch. f. mikrosk. Anat. Bd. 16 u. 18. 1879—81.
— Zellsubstanz, Kern- und Zellteilung. Leipzig 1882.
— Mitteilungen zur Färbetechnik. In: Zeitschr. f. wiss. Mikroskop. Bd. I. 1884.
— Referate über die „Zelle“ In: Ergebn. d. Anat. und Entwicklungsgesch. (Merkel u. Bonnet). Bd. 3—7. 1893—97.
Gierke, Färberei zu mikroskopischen Zwecken. I u. II. In: Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie Bd. 1 u. 2. 1884, 1885.
Groß, R., Beobachtungen u. Versuche an lebenden Zellkernen. In: Archiv f. Zellforschung. Bd. 14. 1917.
Hammarsten, O., Zur Kenntnis der Nukleoproteide. In: Zeitschr. f. Physiol. Chem. Bd. 19. 1894.
Heidenhain, M., Die Anilinfarben als Eiweißfällungsmittel. In: Münch. med. Wochenschrift. 1902.
— Über chemische Umsetzungen zwischen Eiweißkörper und Anilinfarben. In: Pflüger's Archiv. Bd. 90. 1902.
— Über chemische Anfärbungen mikroskopischer Schnitte und fester Eiweißkörper. In: Zeitschr. s. wiss. Mikroskop. Bd. 19. 1902.

Heidenhain, M., Neue Versuche über die chemischen Umsetzungen zwischen Eiweißkörpern und Anilinfarben, insbes. unter Benutzung der Dialyse. In Pflügers Archiv. Bd. 96. 1903.
— Plasma und Zelle. 1. Abt. Allgemeine Anatomie d. lebendigen Masse. 1. Liefg. Jena 1907.
Heine, L., Mikrochemie d. Mitose. In: Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21. 1896.
Hertwig, R., Über Befruchtung und Konjugation. In: Verhandl. d. deutsch. zool Gesellsch. 1892.
Hoppe-Seyler, F. Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. In: Med. chem. Unters. a. d. Labor. f. angew. Chem. zu Tübingen. 4. Hft. Berlin 1871.
Kanitz, A., Das Protoplasma als chemisches System. In: Handb. d. Biochemie v. Oppenheimer. Bd. II, 1. Jena 1910.
— Blutkörperchen. Spermatozoen. In: Handb. d. Biochemie v. Oppenheimer. Bd. II. 1. Jena 1910.
Klug, F., Untersuchungen über Pepsinverdauung. In: Pflügers Archiv, Bd. 60. 1895.
Knecht u. Appleyard, Zur Theorie des Färbens. In: Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 22, 1889.
Kossel, A., Zur Chemie des Zellkerns. In: Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 7. 1883.
— Über die Nukleine und ihre Spaltungsprodukte. Straßburg 1881.
— Weitere Beiträge zur Chemie des Zellkerns. In: Zeitschr. f. physiol. Chemie. 1886.
— Über die chemische Zusammensetzung der Zelle. Dubois Reymond's Archiv 1891.
— Über die Nukleinsäure. ebd. 1893.
— Über den gegenwärtigen Stand der Eiweißchemie. In: Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. 1901.
— Weitere Mitteilungen über Proteine der Fischspermien. In: Sitzungsber. d. Heidelberger Akad. d. Wiss. Math.-nat. Kl. 1913.
Levene u. Mandel, Darstellung und Analyse einiger Nukleinsäuren, 1—12. In: Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, 37, 39, 43, 45, 46, 47, 49, 50. 1901—05.
Lilienfeld, L., Die morphologische und chemische Zusammensetzung des Protoplasmas. Breslau 1887.
— Über die Wahlverwandtschaft der Zellelemente zu gewissen Farbstoffen. Dubois-Reymond's Archiv. 1893.
— Zur Chemie der Leukocyten. In: Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 18. 1893.
Macallum, A. B., On the distribution of assimilated iron compounds, other than Haemoglobin and Haematin, in animal and vegetable cells. In: Quart. Journ. of microsc. sc. Vol. 38. 1896
— Mikrochemie in der biologischen Forschung. In: Asher u. Spiro, Ergebn. d. Physiol. Bd. 7. 1908.
Malfatti, H., Zur Chemie des Zellkerns. In: Ber. d. naturw.-med. Ver. zu Innsbruck. Jg. 20. 1891/92.
— Beiträge zur Kenntnis der Nukleine. In: Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 16. 1892.
Masing, E., Zur Frage der Bedeutung des Eisens für die tierischen Oxydationen. In: Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 66. 1910.
Mayer, P., Beruht die Färbung der Zellkerne auf einem chemischen Vorgang oder nicht? In: Anat. Anz. Bd. 13. 1897.
Michaelis, L., Die Theorie des Färbeprozesses. In: Handb. d. Biochemie von Oppenheimer. Bd. II, 1. Jena 1910.
Miescher, Histochemische und physiologische Arbeiten. Ges. u. herausgeg. von seinen Freunden. Leipzig 1897.
Nietzki, R., Chemie der organischen Farbstoffe. 5. Aufl. Berlin 1906.
Pappenheim, A., Grundriß der Farbchemie zum Gebrauch bei mikroskopischen Arbeiten. Berlin 1901.
Reinke, J., Die chemische Zusammensetzung des Protoplasmas von Aethalium septicum. In: Untersuchungen a. d. bot. Labor. d. Univ. Göttingen. Hft 2 u. 3. 1881/83.

Rohde, E., Untersuchungen über den Bau der Zelle. I: Kern- und Kernkörper. In: Zeitsch. f. wiss. Zool. Bd. 73. 1903.
Rosen, F., Beiträge zur Kenntnis der Pflanzenzellen. I: Über tinktionelle Unterscheidung verschiedener Kernbestandteile und der Sexualkerne. In: Cohn's Beitr. z. Biol. d. Pflanzen. Bd. 5. 1892.
Sauerland, F., Über den Eisengehalt der echten Nukleinsäure. In: Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64. 1910.
Schottländer, P., Beiträge zur Kenntnis des Zellkerns und der Sexualzellen bei Kryptogamen. In: Cohn's Beitr. z. Biol. d. Pflanzen. Bd. 6. 1892.
Schwarz, Fr, Die morphologische und chemische Zusammensetzung des Protoplasmas. In: Cohn's Beitr. z. Biol. d. Pflanzen. Bd 5. 1887.
Steudel, H., Über den Aufbau der Nukleinsäure aus der Thymusdrüse. In: Zeitschr. f physiol. Chemie. Bd. 77. 1912
Unna, Über weitere Versuche, Farben auf dem Gewebe zu erzeugen und die chemische Theorie der Färbung. In: Arch. f. mikrosk. Anat. Bd. 30. 1887.
Witt, O. N., Zur Theorie des Färbeprozesses. In: Färbeztg. 1890/91.
Witt u. Buntrock, Chemische Technologie der Gespinstfasern. Braunschweig 1902.
Zacharias, E., Über die chemische Beschaffenheit des Zellkerns. In: Bot. Ztg. Bd. 39. 1881.
— Über die Spermatozoiden. Ebd 1881.
— Über den Zellkern. Ebd. Bd. 40. 1882.
— Über Eiweiß, Nuklein und Plastin. Ebd. 1883.
— Über den Nukleolus. Ebd. 1885.
— Beiträge zur Kenntnis des Zellkernes und der Sexualzellen. Ebd. Bd. 45. 1887.
— Über Chromatophilie. In: Ber. d. deutsch. bot. Gesellsch. Bd. 11, 1893.
— Über das Verhalten des Zellkerns in wachsenden Geweben. In: Flora. Bd. 81. 1895.
— Einige mikrochemisehe Untersuchungsmethoden. In: Ber. d. deutsch. bot. Gesellsch. Bd. 14. 1896.
— Über Nachweis und Vorkommen von Nuklein. Ebd. Bd. 16. 1898.
— Beiträge zur Kenntnis der Sexualzellen. Ebd. Bd. 19. 1901.
— Über die achromatischen Bestandteile des Zellkernes. Ebd. Bd. 20. 1902.
— Die chemische Beschaffenheit von Protoplasma und Zellkern. In: Progressus rei botanici. Bd. 3. 1909.
Zimmermann, A., Über die chemische Zusammensetzung des Zellkerns. In: Zeitschr. f. wiss. Mikroskop. Bd. 12. 1895.
— Die Morphologie und Physiologie des pflanzlichen Zellkerns. Jena 1896.

Lebenslauf.

Ich, Andreas Pratje, wurde am 3. Februar 1892 als Sohn des verstorbenen Kaufmanns Otto Pratje in Bremen geboren und besitze preußische und bremische Staatsangehörigkeit. Ich besuchte das Neue Gymnasium in Bremen und legte dort 1910 meine Reifeprüfung ab. Seit Herbst 1910 studierte ich an den Universitäten München, Leipzig und Freiburg i. B. Naturwissenschaften und Medizin. August 1914 trat ich als Kriegsfreiwilliger ins Heer ein und war bis Dezember 1918 bei verschiedenen Feldartillerieregimentern im Felde, anfangs als Artillerist, später im Kriegssanitätsdienst als Feldunter- und Feldhilfsarzt. Am 5. Oktober 1917 bestand ich die ärztliche Vorprüfung in Freiburg i. B. und am 12. Oktober 1917 die Promotionsprüfung bei der naturwissenschaftlich-mathematischen Fakultät Freiburg i. B. Zu Beginn des ersten Zwischensemesters, Februar 1919, wurde ich 2. Assistent am Zoologischen Institut der Universität Breslau und setzte gleichzeitig mein medizinisch-klinisches Studium an der Breslauer Universität fort, wo ich 1920 das medizinische Staatsexamen und die mündliche medizinische Doktorprüfung bestand.

K. Hof- u. Univ.-Buchdruckerei
von Junge & Sohn in Erlangen.